

# EFFECTO DE *Fusarium circinatum* EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Pinus greggii* EN TRES SUSTRATOS

## EFFECT OF *Fusarium circinatum* ON GERMINATION AND GROWTH OF *Pinus greggii* SEEDLINGS IN THREE SUBSTRATES

Silvia E. García-Díaz<sup>1</sup>, Arnulfo Aldrete<sup>2\*</sup>, Dionicio Alvarado-Rosales<sup>1</sup>, David Cibrián-Tovar<sup>3</sup>, José T. Méndez-Montiel<sup>3</sup>, Guadalupe Valdovinos-Ponce<sup>1</sup>, Armando Equihua-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Postgrado en Fitosanidad. <sup>2</sup>Postgrado en Ciencias Forestales. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (aaldrete@colpos.mx). <sup>3</sup>División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Texcoco, Estado de México.

### RESUMEN

La enfermedad de la secadera afecta en pre-emergencia, post-emergencia y causa constricción del tallo y pudrición de la raíz en plantas desarrolladas en viveros forestales. Los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y molecularmente la especie de *Fusarium* que afecta al vivero de Atlangatepec, Tlaxcala, que causa secadera y pudrición de raíz en *Pinus greggii* Engelm., evaluar su efecto en la germinación de semillas en tres sustratos y analizar la incidencia y patogenicidad en plántulas en desarrollo. El hongo *Fusarium* sp. se aisló de plántulas enfermas, se purificó e identificó por su morfología y molecularmente como *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell. Los sustratos fueron turba de musgo, perlita y vermiculita (S1), aserrín, corteza y turba de musgo (S2) y corteza, aserrín y turba de musgo (S3) y se evaluaron en proporciones de 60:20:20. El diseño experimental fue completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. El análisis estadístico del porcentaje de germinación se realizó con ANDEVA y la comparación de medias con la prueba de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). El hongo redujo significativamente la germinación de semillas de *P. greggii*. La incidencia de la enfermedad fue menor en S2, en los primeros dos meses y su patogenicidad en post-emergencia se comprobó con la inducción de síntomas y reisolamientos de *F. circinatum*.

**Palabras claves:** viveros, incidencia, turba de musgo, corteza de pino y aserrín.

### INTRODUCCIÓN

En México, el género *Pinus* incluye las especies más utilizadas para producir planta para reforestación en viveros forestales de clima

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2016. Aprobado: junio, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 895-908. 2017.

### ABSTRACT

The drying disease affects plants grown in forest nurseries during the pre-emergence and post-emergence stages, constricting the stem and causing root rot. The objectives of this study were to identify the morphological and molecular characteristics of the *Fusarium* species that affects the nursery located in Atlangatepec, Tlaxcala, which causes the drying disease and root rot of *Pinus greggii* Engelm., to evaluate its effect in the germination of seeds in three substrates, and to analyse the incidence and pathogenicity of developing seedlings. The *Fusarium* fungus was isolated from diseased seedlings, it was purified, and, based on its morphology and molecular structure, as identified as *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell. The substrates were: peat moss, perlite, and vermiculite (S1); sawdust, bark, and peat moss (S2); and bark, sawdust, and peat moss (S3); they were evaluated in 60:20:20 ratios. The experiment had a completely randomized design, with six treatments and four repetitions per each one. The statistical analysis of the germination percentage was executed with ANOVA and the means comparison was carried out using the Duncan test ( $p \leq 0.05$ ). The fungus produced a significant reduction in the germination of *P. greggii*'s seeds. Disease incidence was lower in S2, during the first two months, and its post-emergence pathogenicity was proved by the induction of symptoms and reisolations of *F. circinatum*.

**Key words:** nurseries, incidence, peat moss, pine bark, and sawdust.

### INTRODUCTION

In Mexico, the *Pinus* genus includes the species that are most frequently used in forest nurseries in temperate zones to produce plants for reforestation purposes. An important part of the

templado. En los viveros se realiza una fase importante en el proceso de producción de plantas, que debe garantizar la calidad y sanidad de los árboles, previa a su plantación (Solano y Brenes, 2012).

La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) restaurará un millón de hectáreas, de 2013 a 2018, con reforestación de 180 millones de plantas, en los ecosistemas de clima templado-frío, tropical, y árido-semiárido (CONAFOR, 2015). El problema fitosanitario mayor en los viveros es una enfermedad conocida como el complejo *damping-off*, mal del semillero, secadera de la planta, mal del talluelo, ahogamiento, chupadera y pudrición de raíces. La enfermedad de la secadera la produce un complejo de hongos del suelo, y destacan: *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. (Salas, 2002; Benítez *et al.*, 2004 y Ezziyyani *et al.*, 2004).

La enfermedad de la secadera en pino en los viveros de México la causan principalmente especies de *Fusarium*, y disminuye la calidad de la planta, que ocasiona pérdidas de hasta 40 % en la producción (Cibrián *et al.*, 2008). Se presenta en pre-emergencia, donde el hongo daña al embrión antes de germinar y hay necrosis de hipocótilo y cotiledones, o en post-emergencia, cuando el hongo causa estrangulamiento del tallo, a nivel del suelo, y muerte de la planta. El daño tardío se manifiesta durante el desarrollo de la planta, principalmente cuando el tallo aún no está lignificado, causa pudrición de raíz y doblamiento de la plántula, se manifiesta como un color rojizo en las acículas y en raíz presenta un color café (Peterson, 2008; Solano y Brenes, 2012).

La mayoría de los viveros usa envases plásticos rígidos y principalmente turba de musgo (peat moss), perlita y vermiculita, combinación conocida como mezcla estándar o mezcla base, como medio de crecimiento para la producción de las plantas (Sánchez-Córdoba *et al.*, 2008). Una de las desventajas de esta mezcla es su costo alto para la producción de plantas en vivero. Además, por su contenido alto de materia orgánica y humedad puede dañar a la planta por el desarrollo de *Fusarium*. Como alternativa, para sustratos se usan aserrín y corteza de pino, por su costo menor (Maldonado-Benitez *et al.*, 2011; Hernandez-Zarate *et al.*, 2014).

En los viveros forestales de México la semilla usada para la producción de plantas se desinfecta solo algunas veces y la presencia de especies de *Fusarium*

plant production process takes place in the nurseries; therefore, the quality and health of the trees must be guaranteed, before they are planted (Solano and Brenes, 2012).

The Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), the institution in charge of Mexican forests, will restore a million hectares from 2013 to 2018, reforesting 180 million plants, in the temperate-cold, tropical, and arid-semiarid ecosystems (CONAFOR, 2015). The main phytosanitary problem faced by nurseries is a disease known as the damping-off complex, nursery disease, drying disease, stem disease, choke disease, strangulation, and root rot. The drying disease is produced by a soil fungi complex that includes: *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Botrytis* spp., and *Fusarium* spp. (Salas, 2002; Benítez *et al.*, 2004; and Ezziyyani *et al.*, 2004).

The drying disease that affects pines in Mexican nurseries is mainly caused by *Fusarium* species. It diminishes the quality of the plant, causing the production to drop by up to 40 % (Cibrián *et al.*, 2008). It appears during the pre-emergence stage—when the fungus damages the embryo before it germinates, resulting in hypocotyl and cotyledon necrosis—and during the post-emergence stage—when the fungus strangles the stem, at ground level, and kills the plant. Late damage occurs during the plant's development, mainly when the stems have not yet achieved the hardening stage, causing the root to rot and the seedling to fold; it can be observed as reddish needles and brown roots (Peterson, 2008; Solano and Brenes, 2012).

Most of the nurseries use rigid plastic containers and mainly peat moss, perlite, and vermiculite, a mixture known as standard mixture or base mixture, as the environment where plants are grown (Sánchez-Córdoba *et al.*, 2008). One of the disadvantages of this mixture is its high cost for the production of plants in nurseries. Additionally, its high organic matter and humidity content can encourage the development of *Fusarium* and damage the plant. Pine sawdust and bark are used as a less expensive alternative substrates (Maldonado-Benitez *et al.*, 2011; Hernandez-Zarate *et al.*, 2014).

The seeds used to produce plants in Mexico's forest nurseries are not often disinfected and the presence of *Fusarium* species can damage the germination and development of plants. The objectives of this study were to achieve a morphological and molecular

puede dañar la germinación y el desarrollo de las plantas. Los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y molecularmente la especie de *Fusarium* que causa secadera y pudrición de raíz en *Pinus greggii* Engelm., evaluar su efecto en la germinación de las semillas en tres sustratos y analizar la incidencia y patogenicidad en plántulas en desarrollo. La hipótesis fue que la incidencia de *Fusarium* aumenta con el contenido de turba en el sustrato.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolecta y manejo de material enfermo

El material enfermo de *P. greggii* se recolectó en el vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala (19° 32' 27.6" N, 98° 10' 48" O y altitud de 2510 m). Trozos de raíz de 1 cm del material recolectado se lavaron con agua destilada estéril, hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min y tres veces con agua destilada estéril. El material se secó con papel filtro estéril y se utilizó para sembrar, como lo señalan Martínez-Álvarez *et al.* (2012), en medio papa dextrosa agar con antibiótico (PDA+A) (sulfato de estreptomina 0.05 g L<sup>-1</sup> para prevenir el desarrollo de bacterias).

### Identificación morfológica

#### Microscopía convencional

Para identificar *Fusarium* mediante su morfología se observó el tipo de crecimiento, aspecto del micelio, coloración de la colonia, formación de estructuras asexuales, presencia de clamidosporas y formación de esporodoquios; 100 mediciones de conidióforos, clamidosporas, micro y macroconidios se hicieron con base en estudios de Morales *et al.* (2007) y Pfenning *et al.* (2014). Para su desarrollo, crecimiento y esporulación se utilizaron medios de cultivo recomendados por Leslie y Summerell (2006), como papa dextrosa agar (PDA), agua agar con hoja de clavel (AAC) y el específico para *Fusarium*, conocido como spezieller Nährstoffarmer agar (SNA).

#### Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Plántulas enfermas con micelio se usaron para ver los microconidios, fialides y polifialides; para los macroconidios y estimular el desarrollo de esporodoquios se hicieron crecer en medio de cultivo agua agar con hoja de clavel (CMA). Trozos pequeños de tejido, con estructuras, se colocaron en una solución fijadora de glutaraldehído al 3 % por 24 h, luego se enjuagaron por 10 min, dos veces, con amortiguador de fosfato; las muestras se

identificaron de la *Fusarium* especie que causa el secado y pudrición de la raíz de *Pinus greggii* Engelm., para evaluar su efecto en la germinación de las semillas en tres sustratos, y para analizar la incidencia y patogenicidad en plántulas en desarrollo. La hipótesis fue que, a medida que aumenta el contenido de turba en el sustrato, también aumenta la incidencia de *Fusarium*.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection and handling of diseased material

*P. greggii's* diseased material was collected in the Army's Forest Nursery at Atlangatepec, Tlaxcala (19° 32' 27.6" N, 98° 10' 48" W, at an altitude of 2510 m). One centimeter long root bits were collected and washed with sterile distilled water, sodium hypochlorite at 2 %, for 3 min, and thrice with sterile distilled water. The material was dried with sterile filter paper and was sown, as indicated by Martínez-Álvarez *et al.* (2012), in a potato dextrose agar with antibiotics (PDA+A) (0.05 g L<sup>-1</sup> streptomycin sulphate to prevent the development of bacteria).

### Morphological identification

#### Conventional microscopy

In order to identify *Fusarium* based on its morphology, the following characteristics were observed: type of growth, aspect of the mycelium, coloration of the colony, formation of asexual structures, presence of chlamydospores, and formation of sporodochia. Based on studies by Morales *et al.* (2007) and Pfenning *et al.* (2014), 100 measurements of conidiophores, chlamydospores, microconidia, and macroconidia were made. The culture media recommended by Leslie and Summerell (2006) were used to develop, grow, and sporulate, including potato dextrose agar (PDA), water agar with carnation leaf (AAC), and the specific *Fusarium* culture medium known as spezieller Nährstoffarmer agar (SNA).

#### Scanning electronic microscopy (SEM)

Diseased seedlings with mycelia were used to observe microconidia, phialides, and polyphialides. In order to observe microconidia and foster the development of sporodochia, they were grown in a water agar with carnation leaves (CMA) medium. Small bits of tissue, with structures, were placed in a 3 % glutaraldehyde fixation solution for 24 h; later, they were rinsed twice for 10 minutes using a sulphate buffer solution; the samples were dehydrated for 40-minute periods with growing

deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %), por 40 min cada una, y dos repeticiones con etanol al 100 %. Después, las muestras se secaron a punto crítico, con CO<sub>2</sub> en una secadora (Sandri-780<sup>a</sup>, TOSIMIS Research Corporation, USA). Las muestras deshidratadas se colocaron en portamuestras de latón, se fijaron con cinta adhesiva de cobre y se recubrieron con oro, durante 10 min, en una ionizadora de metales (Fine Coat JFC-1100, JEOL Ltd., Japón) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390, JEOL Ltd., Japón), operado a 20 kV, en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el Estado de México.

### Identificación molecular

Un cultivo monoconidial con la clave PGAT de plántulas de *P. greggii*, del vivero forestal de Atlangatepec se utilizó para la identificación molecular. La extracción de ADN se realizó con el kit comercial DNeasy Plant mini kit (Quick-Start Protocol, Cat. Nos. 69104 and 69106, QIAGEN). Con 100  $\mu$ L de ADN en solución se amplificó con el gen factor de elongación (TEF), que codifica para el factor de elongación  $1\alpha$ . Este es un componente del proceso de síntesis de proteínas en eucariotas y archae (O'Donnell *et al.*, 1998 y Pfenning *et al.*, 2014), con ATGGGTAAGGAGGACAAGAC (EF1) y GGAAGTACCAGTGATCATGTT (EF2) como iniciadores. El termociclador (Multigene Gradient) se utilizó con el programa: desnaturalización inicial 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C 1 min, alineamiento a 53 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 5 min (Geiser *et al.*, 2005). El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1 % y se tiñó con gel red (Biotium, USA). La banda se visualizó en un sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak). El producto de PCR se purificó con el kit Wizard SV (Promega). La secuenciación se hizo en un ABI Autosequencer (Applied Biosystems, USA) en Macrogen. La secuencia se comparó con las reportadas en la base de datos del banco de genes NCBI y se realizó la construcción de un árbol filogenético.

### Análisis filogenético

Las secuencias de ambas hebras de ADN se ensamblaron y editaron con BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el que se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se compiló en un archivo Fasta y se alineó con Profile mode del Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), del programa Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) y analizó con el método de máxima parsimonia (Cuadro 1). Los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante se obtuvieron con análisis de bootstrap, con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

concentrations of ethanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %), and finally with two repetitions with 100 % ethanol. Afterwards, the samples were taken to a critical point drying, using CO<sub>2</sub> in a Sandri-780<sup>a</sup> dryer (Tousimis Research Corporation, USA). The dehydrated samples were placed in tin sampler holders, fixed with copper adhesive tape, and coated with gold, for 10 min using an ion sputter (Fine Coat JFC-1100, JEOL Ltd., Japan) and were observed with a scanning electronic microscope (JSM-6390, JEOL Ltd., Japan), operated at 20 kV, at the Electronic Microscopy Unit of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

### Molecular identification

A monoconidial culture with the PGAT code taken from *P. greggii* seedlings from the forest nursery at Atlangatepec was used for the molecular identification. DNA was extracted with the DNeasy Plant mini kit (Quick-Start Protocol, Cat. No. 69104 and 69106, QIAGEN). One-hundred  $\mu$ L of DNA in a solution were amplified with the translator elongation factor (TEF) gene that encodes for the elongation factor  $1\alpha$ . This is a component of the protein synthesis process in eukaryotes and archae (O'Donnell *et al.*, 1998; Pfenning *et al.*, 2014), with ATGGGTAAGGAGGACAAGAC (EF1) and GGAAGTACCAGTGATCATGTT (EF2) as initiators. The Multigene Gradient thermal cycler was used with the following program: initial denaturation at 94 °C for 2 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, alignment at 53 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 minute, and final extension at 72 °C for 5 min (Geiser *et al.*, 2005). The amplified fragment was verified in an agarose gel at 1 % and it was dyed with RedGel (Biotium, USA). The band was visualized with an imaging system (Gel Lock 200, Kodak). The PCR product was purified with the Wizard SV kit (Promega). The sequencing was carried out in an ABI Autosequencer (Applied Biosystems, USA) with Macrogen. The sequence was compared with the sequences reported in the NCBI genome database and a phylogenetic tree was developed.

### Phylogenetic analysis

The sequences of both DNA strands were assembled and edited with BioEdit v. 7.0.5 (Hall, 1999), thus creating a consensus sequence. This sequence was compiled in a Fasta file, using the Profile mode of Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) of the Mega 5.1 software (Tamura *et al.*, 2011), and it was analysed with the method of maximum parsimony (Table 1). Trust values for blocks within the resulting tree were obtained with a bootstrap analysis with 1000 repetitions (Felsenstein, 1985).

**Cuadro 1. Especies y secuencias del GenBank para la construcción del árbol filogenético.**  
**Table 1. Species and sequences from the GenBank used to develop the phylogenetic tree.**

| Especie                    | Código de GenBank | Referencia                               |
|----------------------------|-------------------|--|
| <i>F. oxysporum</i>        | KF728241          | Han <i>et al.</i> (2013) <sup>†</sup>    |
| <i>F. solani</i>           | KF689008          | Siti y Nagao (2013) <sup>†</sup>         |
| <i>F. circinatum</i>       | KC514061          | Hamelin <i>et al.</i> (2013)             |
| <i>F. subglutinans</i>     | KM462979          | Funnell-Harris <i>et al.</i> (2015)      |
| <i>F. proliferatum</i>     | FJ603502          | Nayaka <i>et al.</i> (2008) <sup>†</sup> |
| <i>F. pseudocircinatum</i> | JF979415          | Shiraishi <i>et al.</i> (2012)           |

<sup>†</sup>Han, K. S., S. C. Lee, J. S. Lee, J. W. Soh, and M. J. Park. 2013. Analysis of taxonomic relationships of *Fusarium oxysporum* f. sp. Based on TEF gene región. Horticultural and Herbal Science. Unpublished. Siti J., and H. Nagao. 2013. Determination of race of *Fusarium solani* isolated from canker symptom on pumpkin and relationship among isolates from different origins. School of Biological Sciences University Sains Malaysia. Unpublished. Nayaka, S. C., E. G. Wulff, U. A. C. Shankar, C. N. Mortensen S. R. Niranjana, and H. S. Prakash. 2008. Applied Botany and Biotechnology University of Mysore. India. Unpublished.

### Inoculación de semilla de *P. greggii* con *Fusarium*

Las semillas se mantuvieron con peróxido de hidrógeno al 30 % por 1 h. Para la inoculación de *Fusarium* (F) tres cajas con micelio puro y desarrollo del hongo se trituraron en licuadora con 300 mL de agua destilada estéril; las semillas se impregnaron por 24 h con esta suspensión ( $7.9 \times 10^4$  esporas por mL). De las semillas no germinadas y de plántulas enfermas se hicieron reisolamientos para comprobar su patogenicidad.

### Efecto de *Fusarium* en semilla *P. greggii* (pre-emergencia) en tres sustratos

El efecto de *Fusarium* se evaluó en un invernadero, de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo), Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México (19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O).

Tres sustratos se evaluaron: (S1) mezcla de turba de musgo (importada de Canadá), perlita y vermiculita, (S2) mezcla de aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo y (S3) mezcla de corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo; todos en proporción de 60:20:20 (Hernandez-Zarate *et al.*, 2014). El aserrín de pino tenía menos de 15 d de aserrado y se obtuvo de un aserradero en Texcoco, Estado de México. La corteza compostada fue de *P. douglasiana* Martínez (empresa MASVI), de la región sur de Jalisco, México. A las mezclas de sustrato se agregó fertilizante de liberación controlada (Osmocote Plus® 8-9 M 15-9-12+ME; eveRRIS ILC Fertilizer Company, Dublin, OH, EE.UU.) en dosis de  $7 \text{ g L}^{-1}$  de sustrato (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

Mesas portatubetes con 42 cavidades, tubetes individuales de 170 mL y semilla de *P. greggii*, de la comunidad de Pueblo Nuevo,

### Inoculation of *P. greggii* seeds with *Fusarium*

The seeds were kept for 1 hour in 30 % hydrogen peroxide. In order to inoculate *Fusarium* (F), three boxes of pure mycelia and developed fungus were ground in a blender with 300 mL of sterile distilled water; the seeds were impregnated for 24 h with this suspension ( $7.9 \times 10^4$  spores per mL). Non-germinated seeds and diseased seedlings were isolated again in order to verify their pathogenicity.

### Effect of *Fusarium* on *P. greggii* seeds (pre-emergence) in three substrates

The effect of *Fusarium* was evaluated in a greenhouse, at the División de Ciencias Forestales (DiCiFo), Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Estado de México (19° 29' 34" N and 98° 53' 38" W).

The following substrates were evaluated: (S1) mixture of peat moss (imported from Canada), perlite, and vermiculite; (S2) mixture of pine sawdust, pine bark, and peat moss; and, (S3) mixture of pine bark, pine sawdust, and peat moss. Their ratio was 60:20:20 (Hernandez-Zarate *et al.*, 2014). The pine sawdust had been sawn less than 15 d before, at a sawmill located in Texcoco, Estado de México. The composted bark came from *P. douglasiana* Martínez trees (MASVI), from southern Jalisco, Mexico. Controlled release fertilizer (Osmocote Plus® 8-9 M 15-9-12+ME; eveRRIS ILC Fertilizer Company, Dublin, OH, USA), in a  $7 \text{ g L}^{-1}$  substrate dose (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016) was added to the substrate mixture.

Container racks with 42 holes, individual 170-mL container racks, and *P. greggii* seeds from the Pueblo Nuevo community, municipality of Chignahuapan, Puebla (19° 52'



municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 52' 60" N y 98° 06' 36" O) se utilizaron en el estudio. La siembra se hizo directa el 13 de febrero de 2015, con dos semillas por tubete. La germinación se evaluó en 40 semillas por repetición (160 semillas por tratamiento y 960 semillas totales). La afectación final por *Fusarium* se evaluó a los 5 meses de edad de la planta. El riego durante la germinación fue ligero y diario y luego cada tercer día.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo factorial 3 (sustratos) × 2 (con y sin *Fusarium*), seis tratamientos y cuatro repeticiones (Cuadro 2). En cada repetición se utilizó una mesa portatubetes y la unidad experimental fueron 20 plantas del centro (80 plántulas por tratamiento). Los resultados se analizaron con el procedimiento Mixto de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, 2002) y comparación de medias de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

### Variables evaluadas

La germinación (emergencia) se evaluó durante febrero y marzo de 2015 y se registró por cuatro semanas para evaluar el efecto de los tratamientos en pre-emergencia. El porcentaje de semillas germinadas se transformaron con la función arcoseno para su análisis. Con el registro semanal de plántulas enfermas se evaluó la post-emergencia y el porcentaje acumulado de plantas con síntomas de secadera por *Fusarium* se cuantificó en 10 semanas, durante marzo, abril y mayo. Al final las plántulas enfermas se transfirieron a medio de cultivo PDA+A, para comprobar los postulados de Koch y obtener nuevamente la cepa inoculada del hongo.

60" N and 98° 06' 36" W) were used in this study. Two seeds were put directly in each container rack on February 13, 2015. Germination was evaluated with 40 seeds per repetition (160 seeds per treatment and 960 seeds overall). The final effect of *Fusarium* was evaluated when the plant was 5 months old. The seeds received light irrigation every day during germination and every third day afterwards.

### Experimental design and statistical analysis

The experiment had a completely randomized design, with a 3 (substrates) × 2 (with and without *Fusarium*) factorial arrangement, six treatments, and four repetitions (Table 2). A container rack was used for each repetition and the experimental unit was made of 20 plants from the center (80 seedlings per treatment). The results were analyzed with the Mixed procedure of SAS, version 9.0 (SAS Institute, 2002) and the means were compared using the Duncan test ( $p \leq 0.05$ ).

### Variables evaluated

Germination (emergence) was evaluated over the course of four weeks in February and March 2015, in order to evaluate the effects of pre-emergence treatments. The percentage of germinated seeds was transformed using the arcsine function for analysis. The weekly record of diseased seedlings was used to evaluate post-emergence and the cumulative percentage with drying disease symptoms caused by *Fusarium* was quantified over the course of 10 weeks, during March, April, and May. Finally, diseased seedlings were transferred to a PDA+A culture medium to verify Koch's postulates and obtain again the inoculated fungus strain.

**Cuadro 2. Tratamientos utilizados en la producción de *Pinus greggii* Engelm., en tubetes individuales de 170 mL.**

**Table 2. Treatments used in the production of *Pinus greggii* Engelm., in 170-mL individual container racks.**

| Sustrato | Mezcla          | Proporciones | Tratamientos                      |
|----------|-----------------|--------------|-----------------------------------|
| S1       | Turba de musgo  | 60           | T1: Inoculado con <i>Fusarium</i> |
|          | Perlita         | 20           | T2: Sin inocular                  |
|          | Vermiculita     | 20           |                                   |
| S2       | Aserrín de pino | 60           | T3: Inoculado con <i>Fusarium</i> |
|          | Corteza de pino | 20           | T4: Sin inocular                  |
|          | Turba de musgo  | 20           |                                   |
| S3       | Corteza de pino | 60           | T5: Inoculado con <i>Fusarium</i> |
|          | Aserrín de pino | 20           | T6: Sin inocular                  |
|          | Turba de musgo  | 20           |                                   |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación morfológica y molecular

El hongo proveniente del vivero de Atlangatepec se identificó como *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell y miembro del complejo *Gibberella fujikuroi* (CGF). Este patógeno infecta sólo árboles de *Pinus* spp. y causa la enfermedad del cancro resinoso en las plantaciones. Wingfield *et al.* (2008) y Gordon *et al.* (2015) lo reportaron como problema fitosanitario importante y amenaza para viveros y plantaciones en el mundo.

En la muestra evaluada se presentó micelio algodonoso, blanco y coloración con pigmentación violeta intensa en PDA (Figura 1 A y B), microconidios ovales sin septos, de  $8 \times 3.5 \mu\text{m}$  (Figura 1 H), microconidios agregados en falsas cabezas (Figura 1 E), que surgen de monofálides y polifálides (Figura 1 D y F). *Fusarium circinatum* puede diferenciarse de *F. pseudocircinatum* por la formación de los microconidios en cadenas cortas y no en falsas cabezas, como lo señalan Nirenberg y O'Donnell (1998). La especie detectada en SNA desarrolló circinas, que son hifas estériles tabicadas y curvadas (Figura 1 I), otras especies que forman estas estructuras son *F. pseudocircinatum* y *F. sterilihyphosum*. *Fusarium circinatum*, no presenta clamidosporas, pero algunas cepas llegan a producir hifas hinchadas que pueden semejarse a clamidosporas o pseudoclamidosporas (Nirenberg y O'Donnell, 1998; Leslie y Summerell, 2006). Nelson *et al.* (1983) y Pfenning *et al.* (2014), reportan esporodochios de color anaranjado pálido formados en agua agar con hoja de clavel, los macroconidios, generalmente de tres septos, miden  $35 \times 4 \mu\text{m}$  (Figura 1 C y G), las células apicales son curvadas y las basales poco desarrolladas.

La identificación molecular de la cepa inoculada se depositó en el banco de genes (GenBank), con número de accesión MF075250 y se alineó en el clado de *F. circinatum*, aislada de la especie de *P. greggii* (Figura 2). Otros hospedantes de pinos afectados por este hongo e identificados molecularmente con iniciadores específicos se reportaron en *P. taeda* con los marcadores moleculares MAT1-1 y MAT1-2 (Pfenning *et al.*, 2014), *P. montezumae* y *P. patula* con  $\beta$ -tubulin, histona H3 y otros (Kvas *et al.*, 2009), y *P. radiata* con CIRC1A Y CIRC4A (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological and Molecular Identification

The fungus from the Atlangatepec nursery was identified as *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell and as a member of the *Gibberella fujikuroi* (CGF) complex. This pathogen only infects *Pinus* spp. trees and it is responsible for pitch canker disease in plantations. Wingfield *et al.* (2008) and Gordon *et al.* (2015) reported it as a significant phytosanitary problem and a threat to nurseries and plantations all over the world.

The sample evaluated showed cottony, white mycelium with an intense violet pigmentation in PDA (Figure 1 A and B),  $8 \times 3.5 \mu\text{m}$  oval microconidia without septa (Figure 1 H), microconidia aggregated in false heads (Figure 1 E), coming out of monophyalides and polyphyalides (Figure 1 D and F). *Fusarium circinatum* can distinguished from *F. pseudocircinatum* based on the formation of microconidia with short chains instead of false heads, as Nirenberg and O'Donnell (1998) pointed out. The species detected in SNA developed circinas, which are partitioned and curved sterile hypha (Figure 1 I). Other species that form these structures are *F. pseudocircinatum* and *F. sterilihyphosum*. *Fusarium circinatum* does not show chlamydo spores, but some strains sometimes produce swollen hypha that may look like chlamydo spores or pseudochlamydo spores (Nirenberg and O'Donnell, 1998; Leslie and Summerell, 2006). Nelson *et al.* (1983) and Pfenning *et al.* (2014) report pale orange sporodochium in water agar with carnation leaves; macroconidia, usually from three septa, measure  $35 \times 4 \mu\text{m}$  (Figure 1 C and G); there are curved apical cells and underdeveloped basal cells.

The molecular identification of the inoculated strain was deposited in the GenBank (accession number MF075250), was aligned with the *F. circinatum* clade that was isolated from the *P. greggii* species (Figure 2). Other pine hosts affected by this fungus and molecularly identified as specific initiators were reported in *P. taeda* with molecular markers MAT1-1 and MAT1-2 (Pfenning *et al.*, 2014), *P. montezumae* and *P. patula* with  $\beta$ -tubulin, histone H3, and others (Kvas *et al.*, 2009), and *P. radiata* with CIRC1A and CIRC4A (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012).

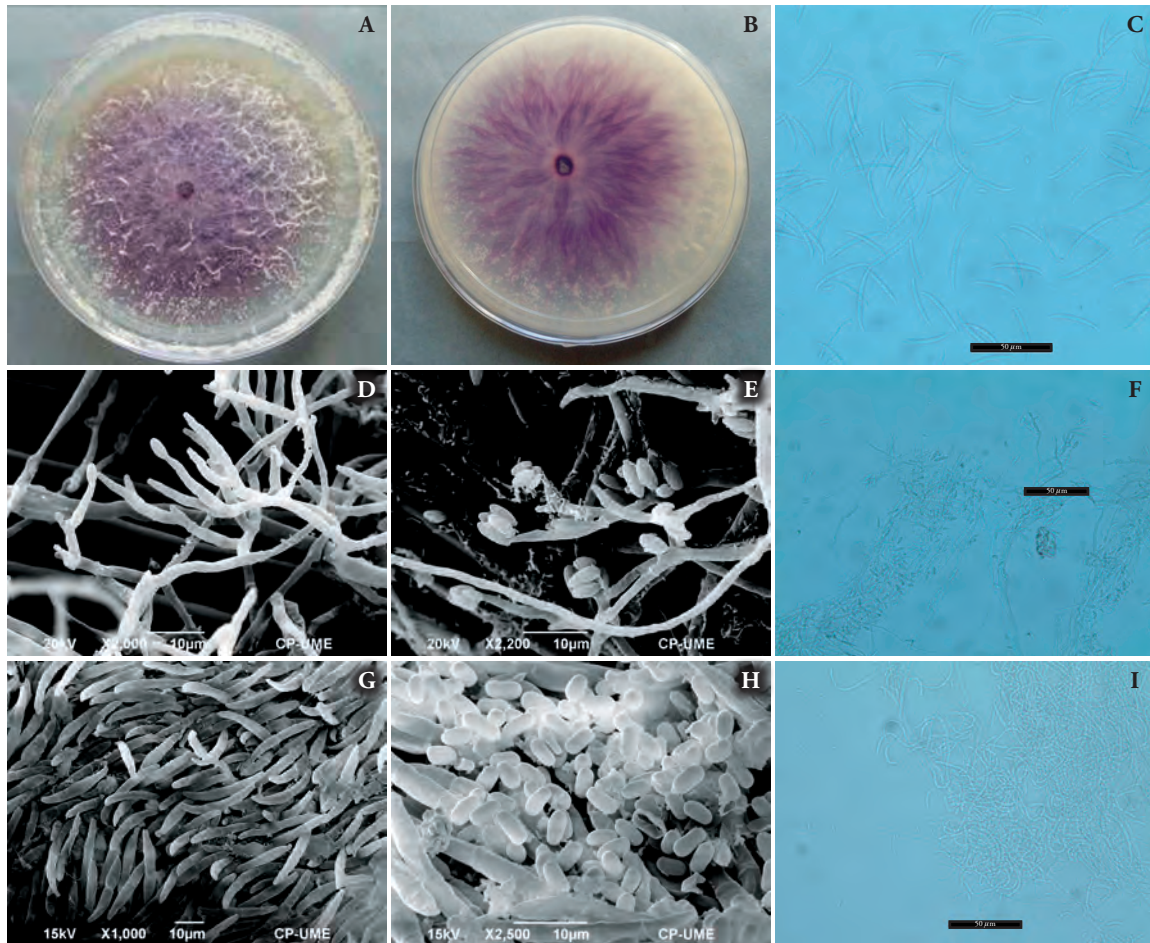


Figura 1. Características de *Fusarium circinatum*. A) Micelio de color blanco a violeta. B) Pigmento violeta en el medio de cultivo. C y G) Macroconidios alantoides. D y F) Monofálides y polifálides de los microconidios. E) Microconidios en falsas cabezas. H) Microconidios de forma ovalada. I) Circinas en medio SNA.

Figure 1. Characteristics of *Fusarium circinatum*. A) White to violet mycelium. B) Violet pigment in the culture medium. C and G) Alantoid macroconidia. D and F) Microconidia's monophyllides and polyphyllides. E) Microconidia with false heads. H.) Oval microconidia. I) Circinas in SNA medium.

### Efecto de *Fusarium circinatum* en semilla (pre-emergencia)

*Fusarium circinatum* redujo 43 % ( $p \leq 0.01$ ) la germinación de semillas de *P. greggii*. Por lo tanto, el porcentaje promedio de germinación pasó de 83 en ausencia del patógeno a 48 cuando la semilla se remojó con *F. circinatum*. La germinación menor (43 %) de los tratamientos inoculados con *F. circinatum* se presentó en el sustrato S2 y en S3 germinó 56 % de las semillas. Swett y Gordon (2015) caracterizaron la habilidad de *F. circinatum* (aislado de pino) para colonizar semilla de maíz (*Zea mays*) y observaron que hasta 98 % de ellas se infectó. En nuestro estudio, en los tratamientos que no tuvieron

### Effect of *Fusarium circinatum* in seeds (pre-emergence)

*Fusarium circinatum* reduced the germination of *P. greggii* seeds by 43 % ( $p \leq 0.01$ ). Therefore, the average germination percentage diminished from 83 (absence of the pathogen) to 48 (after seeds where soaked in *F. circinatum*). The lower germination (43 %) of the treatments inoculated with *F. circinatum* was found in substrate S2, while 56 % of the seeds in S3 germinated. Swett and Gordon (2015) reported that *F. circinatum*, when it has been isolated from the pine, is able to colonize maize seeds (*Zea mays*) and observed that up to 98 % of those seeds was infected. The treatments in our



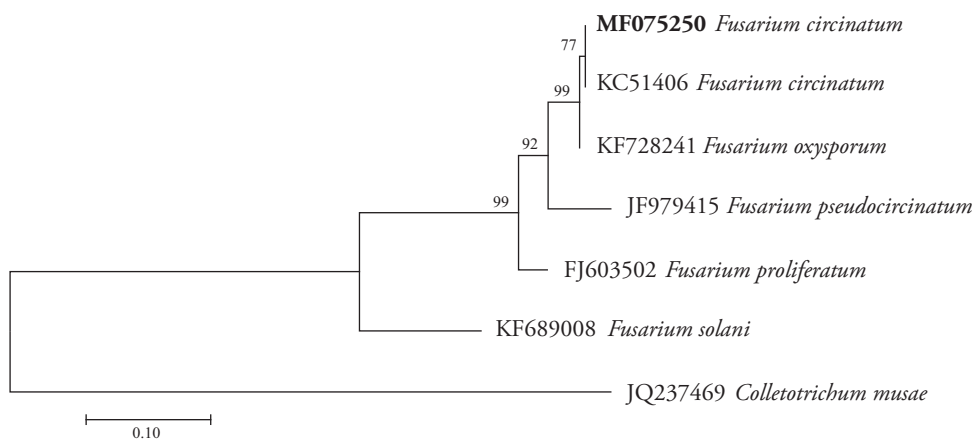


Figura 2. Árbol filogenético del aislado de *Fusarium circinatum*, amplificado por PCR-TEF y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 5.1 y construido con el método de Máxima Parsimonia.

Figure 2. Phylogenetic tree of the *Fusarium circinatum* isolate, with PCR-TEF amplification and its sequences grouped using the MEGA 5.1 software and developed using the method of Maximum Parsimony.

*F. circinatum* se obtuvo más de 80 % de germinación, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los sustratos (Cuadro 3).

Este resultado coincidió con el señalamiento de que *F. circinatum* reduce la germinación en *P. radiata* (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012). Peterson (2008) indicó que *Fusarium* llega a los viveros forestales donde se producen coníferas, principalmente en la testa y en el interior de la semilla (Barrows-Broadus y Dwinell, 1985; Storer *et al.*, 1998), y que *Fusarium* invade el embrión y lo mata (Pfenning *et al.*, 2014).

Las semillas en S1 y S2, en presencia de *F. circinatum*, tuvieron porcentaje de germinación

study that were not inoculated with *F. circinatum* show over 80 % germination, without significant differences ( $p > 0.05$ ) between substrates (Table 3).

This result matched the reports that *F. circinatum* reduces the germination of *P. radiata* (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012). Peterson (2008) indicated that *Fusarium* arrives at the forest nurseries where conifers are produced, mainly in the seed cover and inside the seed (Barrows-Broadus and Dwinell, 1985; Storer *et al.*, 1998) and that *Fusarium* invades the embryo and kills it (Pfenning *et al.*, 2014).

In the presence of *F. circinatum*, S1 and S2 seeds had a relatively lower germination percentage than S3. This matched the report made by Hoitink *et al.*

Cuadro 3. Germinación de semilla de *Pinus greggii* en tres sustratos.

Table 3. Germination of *Pinus greggii* seeds in three substrates.

| Tratamiento | Sustrato | <i>F. circinatum</i> | DS      | % Promedio germinación |
|-------------|----------|----------------------|---------|------------------------|
| T6          | S3       | Ausencia             | ± 6.57  | 86 a                   |
| T4          | S2       | Ausencia             | ± 3.75  | 82 a                   |
| T2          | S1       | Ausencia             | ± 4.27  | 81 a                   |
| T5          | S3       | Presencia            | ± 12.31 | 56 b                   |
| T1          | S1       | Presencia            | ± 7.7   | 46 bc                  |
| T3          | S2       | Presencia            | ± 7.36  | 43 c                   |

Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes con la prueba de Duncan ( $p \leq 0.05$ ). S1: turba de musgo, perlita y vermiculita, S2: aserrín, corteza y turba de musgo y S3: corteza, aserrín y turba de musgo en proporción 60:20:20. DS: desviación estándar. ❖ Mean values with different letters in the same column are statistically different, based on the Duncan test ( $p \leq 0.05$ ). S1: peat moss, perlite, and vermiculite; S2: sawdust, bark, and peat moss; and, S3: bark, sawdust, and peat moss; the ratio for the three was 60:20:20. DS: standard deviation.

relativamente menor que en S3. Esto coincidió con Hoitink *et al.* (1997) quien señaló que con una proporción elevada de turba de musgo aumenta la probabilidad de enfermedades y pudriciones de raíz.

### Efecto de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* (post-emergencia)

La enfermedad se manifestó después de 5 semanas de la inoculación con *F. circinatum* en post-emergencia (Figura 3 A). La sintomatología correspondió a la observada en el vivero forestal militar de Atlangatepec (Figura 3 B). En la etapa de “cerillo” se observó estrangulamiento en el ápice de la planta, con apariencia de deshidratación, después de unos días la plántula no se mantenía erecta y moría (Figura 3 C). Peterson (2008) y Wingfield *et al.* (2008) también observaron que las coníferas son susceptibles a la enfermedad y el hongo en post-emergencia

(1997) that a high rate of peat moss increases the possibility of diseases and root rot.

### Effect of *F. circinatum* in *P. greggii* seedlings (post-emergence)

The disease became evident 5 weeks after *F. circinatum* was inoculated during post-emergence (Figure 3 A). The symptomatology matched the one observed in the Army’s forest nursery at Atlangatepec (Figure 3 B). During the “matchstick” stage, strangulation could be seen in the plant’s apex, which looked dehydrated; after a few days, the seedling could not stand up and died (Figure 3 C). Peterson (2008) and Wingfield *et al.* (2008) also observed that conifers are susceptible to this disease and that, during post-emergence, the fungus grows in the vascular tissue and causes the plant to wither and die.

In 2-3-month-old plants, the main shoot was flaccid and had bent over, the color of the needles

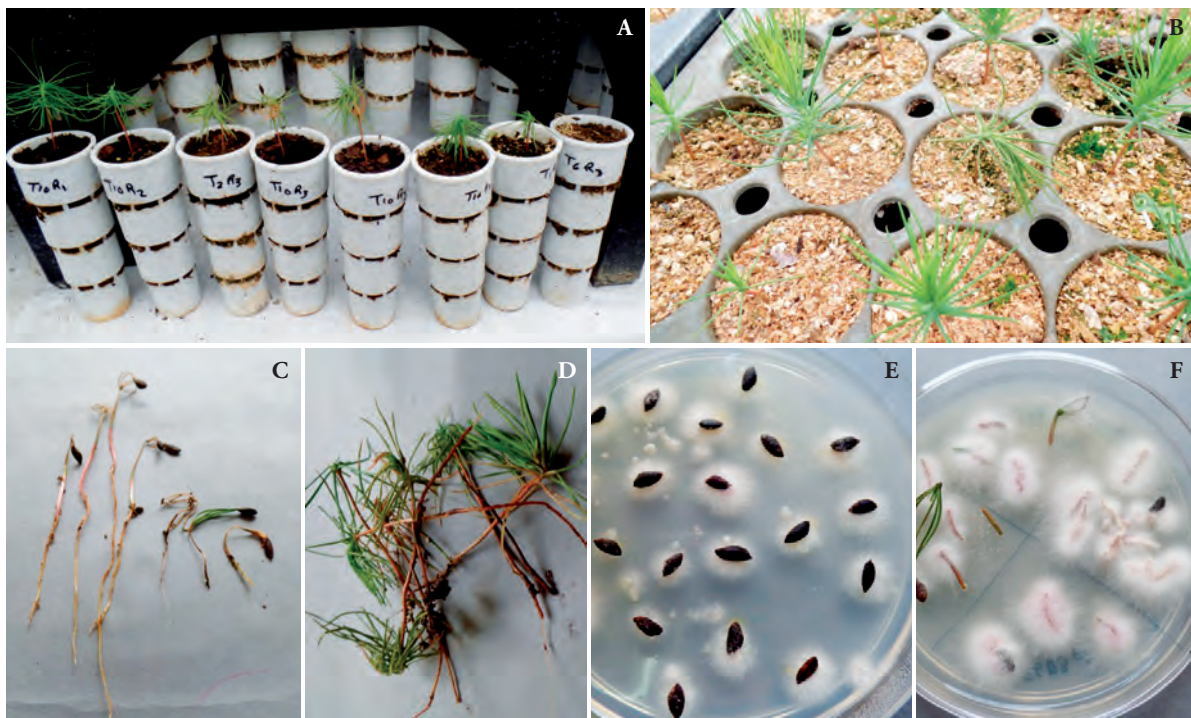


Figura 3. Enfermedad de la secadera causada por *Fusarium circinatum*. A) Plantas enfermas con diferentes avances de síntomas. B) Plántulas de tres meses de edad del vivero de Atlangatepec, Tlaxcala. C) Síntomas en etapa de cerillo. D) Plantas enfermas con tres meses de edad, después de la inoculación. E) Colonias de *F. circinatum*, desarrolladas en PDA+A, con semilla inoculada. F) Reaislamientos de *F. circinatum* en plántulas de un mes.

Figure 3. Drying disease caused by *Fusarium circinatum*. A) Diseased plants with different symptom stages. B) Three-month old seedlings from the nursery at Atlangatepec, Tlaxcala. C) Symptoms during the “matchstick” stage. D). Three-month old diseased plants, after inoculation. E) *F. circinatum* colonies developed in PDA+A, with inoculated seeds. F) *F. circinatum* reisolations in one-month old seedlings.

crece en el tejido vascular y causa marchitamiento y muerte de la planta.

Las plantas de 2 a 3 meses presentaron flacidez y flexión del brote principal, decoloración de acículas, de amarillo a rojizo pardo intenso, pudrición de la raíz primaria y algunas secundarias que adquirieron color café y desintegración de su tejido (Figura 3 D). Estos síntomas coincidieron con los descritos por Herron *et al.* (2015) y Marín-Cruz *et al.* (2015) como marchitamiento, caída del brote terminal, decoloración y pérdida de acículas, en plántulas durante su primer año de edad.

Solano y Brenes (2012) observaron clorosis del follaje o marchitez del ápice del tallo; estos también son síntomas de la pudrición del sistema radicular (Vivas, *et al.* 2009). Las plantas también desarrollan esporodocios blancos o anaranjados pálidos en la base y a lo largo del tallo. Peterson (2008) observó el desarrollo del género *Fusarium* spp. con esporodocios de color salmón a rosa-coral en la base del tallo, pudrición de raíz en post-emergencia y marchitamiento de plántulas; esto confirmó los síntomas de pudrición de raíz en este estudio, con *P. greggii* en post-emergencia y en la plántula.

### Recuperación del patógeno

En medio PDA con antibiótico se recuperó 100 % de aislamientos, a partir de 249 semillas no germinadas (Figura 3 E). De raíz de plántulas enfermas de *P. greggii* se obtuvieron 156 reaislamientos, de un total de 169 (93 %) (Figura 3 F) de los tratamientos con *F. circinatum*. Con esto se comprobó la patogenicidad. En un estudio similar con *F. circinatum* en *Pinus radiata*, un muestreo del 10 % de plantas del experimento generó 100 % de aislamientos (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012). Marín-Cruz *et al.* (2015) lo aislaron de *P. montezumae* y Herron (2015), en plantas de *P. patula*, en vivero.

### Incidencia de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* creciendo en tres sustratos

En el análisis de los tres sustratos con inóculo de *F. circinatum* mostró incremento de la incidencia en *P. greggii* desde la semana uno hasta la semana 10 (Figura 4). La incidencia de *F. circinatum*, en las plantas en S1, en la semana uno fue 22 %; en contraste en S3 y S2 fue 8 % y 0 %. La incidencia en S2 fue la

had changed from yellow to an intense brownish-grey reddish color, the main root had rotten, and some secondary roots had become brown and their tissue had disintegrated (Figure 3 D). These symptoms matched those described by Herron *et al.* (2015) and Marín-Cruz *et al.* (2015) in seedlings up to their first year and they included withering, fall of the terminal bud, discolouring, and loss of needles.

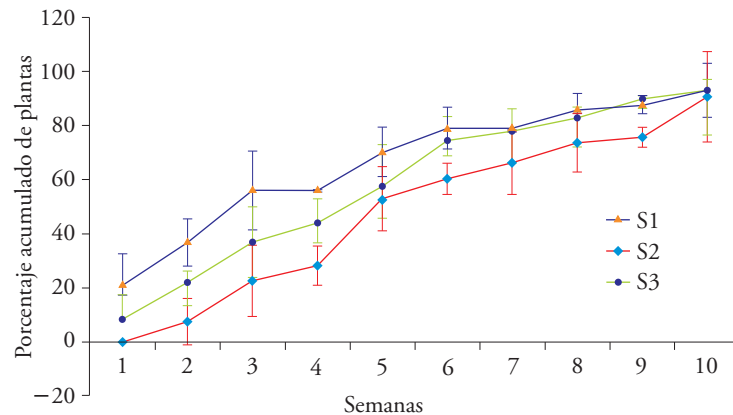
Solano and Brenes (2012) observed foliage chlorosis or withering of the stem's apex: these are also symptoms of rotting in the root system (Vivas *et al.*, 2009). The plants also developed white or pale orange sporodochia in the base and along the stem. Peterson (2008) observed the development of the *Fusarium* spp. genus with salmon to coraline pink on the base of the stem, root rot during post-emergence, and withered seedlings; this information confirmed the root rot symptoms of *P. greggii* during the post-emergence stage and in seedlings.

### Pathogen recovery

One-hundred percent of the isolations—from 249 non-germinated seeds—were recovered from a PDA medium with antibiotics (Figure 3 E). One-hundred fifty-six reisolations were obtained from diseased *P. greggii* seedlings, out of a total of 169 (93 %) (Figure 3 F) of the *F. circinatum* treatments. This proved the pathogenicity. In a similar study, with *F. circinatum* in *Pinus radiata*, a 10 % sample of the experiment's plants produced 100 % isolations (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012). Marín-Cruz *et al.* (2015) isolated *F. circinatum* from *P. montezumae* and Herron (2015) isolated it from *P. patula*, in nursery conditions.

### *F. circinatum* incidence in *P. greggii* seedlings growing in three substrates

The analysis of the three substrates with *F. circinatum* inoculum showed that the incidence in *P. greggii* increased from week 1 to week 10 (Figure 4). *Fusarium circinatum* had a 22 % incidence in S1 plants, during the first week; in contrast, it had an 8 % and 0 % incidence in S3 and S2 plants, respectively. Incidence in S2 was the lowest during the whole evaluation period and it was not until after the fourth week that the number of diseased plants reached 25 % (Figure 4).



**Figura 4.** Incidencia semanal de *Fusarium circinatum* en plantas de *Pinus greggii* creciendo en sustratos diferentes. S1: turba de musgo, perlita y vermiculita, S2: aserrín, corteza y turba de musgo y S3: corteza, aserrín y turba de musgo, con una proporción 60:20:20 en las tres mezclas.

**Figure 4.** Weekly incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus greggii* plants growing in different substrates. S1: peat moss, perlite, and vermiculite. S2: sawdust, bark, and peat moss; and S3: bark, sawdust, and peat moss; with a 60:20:20 ratio in the three mixtures.

menor durante todo el período de evaluación y hasta después de cuatro semanas superó una cuarta parte de plantas enfermas (Figura 4).

En S1 desde la primera semana se observó el porcentaje mayor de planta enferma y en la semana cuatro se había acumulado 56 % (Figura 4). Esto indicó que el sustrato tradicional es el más propicio para el desarrollo de la enfermedad. En S3, con mayor proporción de corteza de pino, el porcentaje de plantas enfermas fue menor en las primeras seis semanas, pero luego igualó a S1.

S2, a base de aserrín, mostró incidencia menor de la enfermedad. En la primera semana no hubo plantas enfermas y en la semana cuatro la incidencia alcanzó solo 28 %, en contraste las plantas enfermas en S1 representaron 56 %. Aunque con S2 la incidencia de *F. circinatum* tardó en presentarse, a las 10 semanas igualó a S1 y S3 (Figura 4).

## CONCLUSIONES

*Fusarium circinatum* se identificó mediante morfología, evaluación molecular y pruebas de patogenicidad en semilla, como el agente causal de la secadera y pudrición de raíz en *P. greggii*. La presencia de este patógeno reduce significativamente la germinación de las semillas. El sustrato a base de

Since the first week, the percentage of diseased plants was greater in S1 and by the fourth week it had reached 56 % (Figure 4). This shows that the traditional substrate is the most favourable for the development of the disease. In S3, which has a greater rate of pine bark, the percentage of diseased plants was lower during the first six weeks, but then it matched S1.

S2, which was made mainly from sawdust, showed a lower disease incidence. There were no diseased plants during the first week and by the fourth week the incidence only reached 28 %, in contrast with 56 % diseased plants in S1. Although *F. circinatum* in S2 turned up late, by the tenth week it had equaled S1 and S3 (Figure 4).

## CONCLUSIONS

Based on its morphology, molecular evaluation, and pathogenicity tests in the seed, *Fusarium circinatum* was identified as the etiologic agent of the drying disease and root rot in *P. greggii*. The presence of this pathogen significantly decreases seed germination. The sawdust-based substrate slows down the incidence of *F. circinatum* in *P. greggii*.

—End of the English version—



aserrín retarda la incidencia de la enfermedad por *F. circinatum* en *P. greggii*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados, gracias a la concesión de una beca de doctorado por parte del CONA-CyT y con apoyo del Fideicomiso 167304 por convocatoria en la Modalidad 3 de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013. Se agradece también a la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en el Estado de México.

## LITERATURA CITADA

- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, T. Martínez-Trinidad, y V. M. Ordáz-Chaparro. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50: 107-118.
- Barrows-Broadus, J., and L. D. Dwinell. 1985. Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Benítez, T., A. M. Rincón, A. C. Limón, and C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.
- Cibrián T., D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p.
- CONAFOR, 2015. La CONAFOR incrementa la calidad de la producción de planta. Boletín informativo 154. [www.conafor.gob.mx:8080/documentos/download.aspx?articulo=6426](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/download.aspx?articulo=6426)
- Ezziyiani, M., S. C. Pérez, A. A. Sid, M.E. Requena, y M. E. Candela, 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *An. Biol.* 26: 35-45.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Funnell-Harris, D. L., S. E. Sattler, P. M. O'Neill, K. M. Eskridge, and J. F. Pedersen. 2015. Effect of waxy (low amylose) on fungal infection of sorghum grain. *Phytopathology* 105: 786-796.
- Geiser, D. M., M. L. L. Ivey, G. Hakiza, J. H. Juba, and S. A. Miller. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia* 97: 191-201.
- Gordon, T. R., C. L. Sweet, and M. J. Wingfield 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Prot.* 73: 28-39.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucle. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-96.
- Hamelin, R. C., P. Tanguay, A. A. Uzunovic, and K. A. Seifert. 2013. Molecular detection assays of forest pathogens. Canadian Forest Service, Natural Resources Canada. <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/KC464626/?filetype=html>. (Consulta: enero, 2017).
- Hernandez-Zarate, L., A. Aldrete, V. M. Ordaz-Chaparro, J. López-Upton, y M. A. López-López. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia* 48: 627-637.
- Herron, D. A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, C. A. Rodas, S. Marincowitz, and E. T. Steen Kamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Mycology* 80: 131-150.
- Hoitink, H. A. J., A. G. Stone, and D. Y. Han. 1997. Supresión de enfermedades de plantas mediante compost. *Agron. Costarric.* 21: 25-35.
- Kvas, M., W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, and E. T. Steenkamp. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Divers.* 34: 1-21.
- Leslie, J. F., and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Asia. 388 p.
- Maldonado-Benitez, K. R., A. Aldrete, J. López, U., H. Vaquera H., y V. M. Cetina A. 2011. Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* 45: 389-398.
- Marín-Cruz, V. H., D. Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam, y J. A. Cruz-Rodríguez. 2015. Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptero: Sciaridae). *Madera Bosques* 21: 113-128.
- Martínez-Álvarez, P., F. M. Alves-Santos, and J. J. Diez. 2012. *In vitro* and *in vivo* interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica* 46: 303-316.
- Morales, R. I., M. J. Yañez, H. Silva, V., and S. García. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico. *Mycopathologia* 163: 31-39.
- Nelson, P. E., T. A. Tousoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park (PA): Pennsylvania State University. 206 p.
- O'Donnell, C. J., K. Lindpaintner, and M. G. Larson. 1998. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772.
- Peterson, M. 2008. *Fusarium* species. A British Columbia perspective in forest seedling production. *In: Dumroese, R. K., Riley L. E.* (technical coordinators). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-57: 109-125.
- Pfenning, L. H., C. S. Da Silva, M. M. De Pereira, H. Costa, V. J. Aires, A. C. García, and S. A. Dos Figueredo. 2014. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 39: 210-216.
- Sánchez-Córdoba, T., A. Aldrete, V. M. Cetina-Alcalá, y J. López-Upton. 2008. Caracterización de medios de crecimiento compuestos por corteza de pino y aserrín. *Madera Bosques* 14: 41-49.
- Shiraishi, A., J. F. Leslie, S. Zhong, and J. Y. Uchida. 2012. AFLP, Pathogenicity, and VCG analyses of *Fusarium oxysporum* and

- Fusarium pseudocircinatum* from Acacia koa. Plant Dis. 96: 1111-1117.
- Swett, C. L., and T. R. Gordon. 2015. Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). Fungal Ecol. 13: 120-129.
- SAS Intitute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- Solano, B. M., y C. D. Brenes. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. Rev. For. Mesoam. Kurú 9: 63-65.
- Storer, A. J., T. R. Gordon, and L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathol. 47: 649-656.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Vivas, M., M. Vrhovnik, y A. Solla. 2009. Fertilización de plántulas de *Pinus pinaster* y su efecto en la susceptibilidad de *Fusarium circinatum*. Montes y Sociedad. 5to. Congreso Forestal Español. pp: 2-10.
- Wingfield, M. J., A. Hammerbacher, R. J. Ganley, E. T. Steenkamp, T. R. Gordon, B. D. Wingfield, and T. A. Coutinho. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* a growing threat to pine plantations and forest worldwide. Aust. Plant Path 37: 319-334.